

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.007

SP-1 通过 miR-135b/HIF-1 α 轴对缺氧诱导 心肌细胞损伤的影响*

孟庆雯, 杨 洋, 魏俊萍, 杨珊珊, 黄 珊[△]

(海南医学院第一附属医院心血管内科, 海南海口 570100)

摘要:目的 探讨特异性蛋白 1(SP-1)通过 miR-135b/HIF-1 α 轴对缺氧诱导的心肌细胞损伤的作用。方法 H9c2 细胞进行缺氧处理后,转染 si-SP-1, miR-135b mimic, anti-miR-135b 和 CoCl₂(HIF-1 α 激活剂)。采用蛋白质印迹(Western Blot, WB)法检测细胞 SP-1 和 HIF-1 α 蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法检测 miR-135b 表达, CCK-8 法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡和活性氧簇(ROS)含量,酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6(IL-6)的含量,生物信息学软件分析预测并通过荧光素酶报告基因实验验证 miR-135b 与 HIF-1 α 间的靶向结合作用。结果 缺氧后, H9c2 细胞内 SP-1 蛋白表达呈时间依赖性显著升高($P < 0.05$), miR-135b 表达呈时间依赖性显著降低($P < 0.05$)。与对照组(A 组)相比,缺氧组(B 组)H9c2 细胞中 SP-1 和 HIF-1 α 蛋白表达分别为 1.467 ± 0.055 , 1.437 ± 0.082 ($P = 0.014$, $P = 0.017$), 细胞凋亡率 [$(14.591 \pm 1.863)\%$, $P = 0.000$]、细胞上清液中 TNF- α [(5.270 ± 0.359) pg/mL, $P = 0.012$]、IL-1 β [(25.060 ± 1.212) pg/mL, $P = 0.000$]、IL-6 [(82.707 ± 4.550) pg/mL, $P = 0.000$] 和 ROS (1.239 ± 0.075 , $P = 0.021$) 含量均显著升高 ($P < 0.05$), miR-135b 表达 (0.466 ± 0.071 , $P = 0.001$) 和细胞增殖能力 [$(67.242 \pm 3.490)\%$, $P = 0.008$] 均显著降低 ($P < 0.05$); 与缺氧 + siRNA 组(C 组)相比,缺氧 + si-SP-1 组(D 组)H9c2 细胞中 SP-1 (0.238 ± 0.039 , $P = 0.001$) 和 HIF-1 α 的蛋白表达 (1.126 ± 0.100 , $P = 0.032$)、细胞凋亡率 [$(4.668 \pm 0.731)\%$, $P = 0.000$]、细胞上清液中 TNF- α [(3.901 ± 0.354) pg/mL, $P = 0.022$]、IL-1 β [(17.198 ± 1.216) pg/mL, $P = 0.002$]、IL-6 [(56.742 ± 4.081) pg/mL, $P = 0.017$] 和 ROS (1.086 ± 0.090 , $P = 0.028$) 含量均显著降低, miR-135b 表达 (0.752 ± 0.094 , $P = 0.015$) 和细胞增殖能力 [$(83.550 \pm 2.933)\%$, $P = 0.016$] 均显著升高。miR-135b 靶向调控 HIF-1 α 。CoCl₂ 或 anti-miR-135b 会导致低表达 SP-1 的缺氧 H9c2 细胞增殖能力显著降低 [$(48.470 \pm 2.831)\%$ 比 $(63.728 \pm 4.192)\%$, $P = 0.000$, $P = 0.021$], 细胞凋亡率 [$(41.076 \pm 1.117)\%$ 比 $(35.935 \pm 1.776)\%$, $P = 0.000$, $P = 0.010$] 和细胞上清液中 TNF- α [(6.211 ± 0.408) pg/mL 比 (5.250 ± 0.325) pg/mL, $P = 0.019$, $P = 0.033$]、IL-1 β [(43.417 ± 2.561) pg/mL 比 (38.675 ± 1.956) pg/mL, $P = 0.013$, $P = 0.021$]、IL-6 [(110.440 ± 7.446) pg/mL 比 (108.767 ± 6.589) pg/mL, $P = 0.026$, $P = 0.031$] 和 ROS [(1.351 ± 0.073) 比 (1.327 ± 0.041) , $P = 0.073$, $P = 0.035$] 的含量显著升高。结论 SP-1 低表达通过 miR-135b/HIF-1 α 轴发挥对缺氧诱导的心肌细胞损伤的保护作用。

关键词: 特异性蛋白 1; 心肌细胞损伤; miR-135b; HIF-1 α ; 缺氧

中图分类号: R965; R972

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)13-0025-07

Low Expression of SP-1 Exerts Protective Effects on Hypoxia-Induced Cardiomyocyte Injury Through the miR-135b / HIF-1 α Axis

MENG Qingwen, YANG Yang, WEI Junping, YANG Shanshan, HUANG Shan

(Department of Cardiovascular Medicine, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China 570100)

Abstract: Objective To investigate the effect of specific protein-1 (SP-1) on hypoxia-induced cardiomyocyte injury through miR-135b / HIF-1 α axis. **Methods** H9c2 cells were transfected with si-SP-1 and miR-135b mimic after hypoxia, anti-miR-135b and CoCl₂ (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α activator), SP-1 and HIF-1 α protein expression were detected by Western Blot (WB); the detection of miR-135b expression was conducted by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR); cholecystokinin octapeptide-8 (CCK-8) were used to detect cell proliferation; flow cytometry was used to detect apoptosis and reactive oxygen species (ROS) content; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was applied to detect the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-6; bioinformatics software analysis was applied to predict and verify the targeted binding effect between miR-135b and HIF-1 α by luciferase reporter gene experiments. **Results** After hypoxia, the expression of SP-1 protein in H9c2 cells increased significantly in a time-dependent manner ($P < 0.05$), and the expression of miR-135b decreased significantly in a time-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, the protein expression of SP-1 and HIF-1 α in H9c2 cells in the hypoxia group were 1.467 ± 0.055 and 1.437 ± 0.082 ($P = 0.014$, $P = 0.017$), and the apoptosis rate [$(14.591 \pm 1.863)\%$, $P = 0.000$], TNF- α [(5.270 ± 0.359) pg/mL, $P = 0.012$], IL-1 β [(25.060 ± 1.212) pg/mL, $P = 0.000$], IL-6 [(82.707 ± 4.550) pg/mL, $P = 0.000$], and ROS (1.239 ± 0.075 , $P = 0.021$) content was significantly increased ($P < 0.05$), miR-135b expression (0.466 ± 0.071 , $P = 0.001$) and cell proliferation ability [$(67.242 \pm 3.490)\%$, $P = 0.008$] were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the

*基金项目: 国家自然科学基金[81960075]。

第一作者: 孟庆雯, 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病、高血压、心衰的诊治及作用机制, (电子信箱) 443130019@qq.com。

[△]通信作者: 黄珊, 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为心律失常诊治及作用机制, (电子信箱) 10572043@qq.com。

hypoxia + siRNA group, the protein expression of SP-1 (0.238 ± 0.039 , $P = 0.001$) and HIF-1 α (1.126 ± 0.100 , $P = 0.032$), apoptotic rate [4.668 ± 0.731], TNF- α [3.901 ± 0.354] pg/mL, $P = 0.022$, IL-1 β [17.198 ± 1.216] pg/mL, $P = 0.002$, IL-6 [56.742 ± 4.081] pg/mL, $P = 0.017$] and ROS (1.086 ± 0.090 , $P = 0.028$) were significantly reduced ($P < 0.05$), miR-135b expression (0.752 ± 0.094 , $P = 0.015$) and cell proliferation capacity [83.550 ± 2.933]%, $P = 0.016$] were significantly increased ($P < 0.05$). miR-135b targets HIF-1 α . CoCl₂ or anti-miR-135b can significantly reduce the proliferation [48.470 ± 2.831]%, $P = 0.000$, $P = 0.021$], and apoptosis rate [41.076 ± 1.117]%, $P = 0.000$, $P = 0.010$] and TNF- α [6.211 ± 0.408] pg/mL vs [5.250 ± 0.325] pg/mL, $P = 0.019$, $P = 0.033$], IL-1 β [43.417 ± 2.561] pg/mL vs [38.675 ± 1.956] pg/mL, $P = 0.013$, $P = 0.021$], IL-6 [110.440 ± 7.446] pg/mL vs [108.767 ± 6.589] pg/mL, $P = 0.026$, $P = 0.031$], and ROS (1.351 ± 0.073) vs (1.327 ± 0.041), $P = 0.024$, $P = 0.035$] significantly increased ($P < 0.05$) of hypoxia H9c2 cells with low expression of SP-1. **Conclusion** The low expression of SP-1 exerts a protective effect on hypoxia-induced cardiomyocyte injury through the miR-135b / HIF-1 α axis.

Key words: specific protein-1; cardiomyocyte injury; miR-135b; HIF-1 α ; hypoxia

心肌缺血性疾病是世界范围内常见的致死、致残疾病之一^[1]。心脏缺血会造成心肌细胞缺氧, 线粒体氧化磷酸化过程受阻, 导致能量代谢障碍和三磷酸腺苷(ATP)生成减少, 引起典型的超微结构和代谢改变, 对心肌产生不可逆损伤^[2]。目前, 对于心肌缺血性损伤的作用机制仍未明确。特异性蛋白1(SP-1)是一种核转录因子, 与多种基因的表达相关^[3]。金属蛋白酶组织抑制剂-3可通过EGFR/JNK/SP-1信号抑制乳鼠心肌细胞增殖, SP-1的下调能促进心肌细胞增殖^[4]。MicroRNAs(miRNAs)是一种非编码的小RNA, 可通过与靶基因mRNA的3'非翻译区(UTR)结合来调节基因表达, 还可参与多种生物学进程, 如肿瘤发生、造血和组织损伤^[5-6]。miR-135b通过靶向CACNA1C改善病理性心肌肥大^[7], 还可改善心功能受损^[8]。缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)是一种核翻译因子, 在缺氧缺血性疾病中起到重要的生物学作用^[9-10], 可靶向抑制HIF-1 α 的表达, 参与细菌性脑膜炎星形胶质细胞的发育^[11]。本研究中探讨了SP-1通过miR-135b/HIF-1 α 轴对缺氧诱导心肌细胞损伤的作用, 为心肌缺血性疾病的治疗提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器: ELx800™型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司); T100型荧光定量聚合酶链式反应(q-PCR)仪(伯乐生命医学产品<上海>有限公司); Biosciences AccuriC6型流式细胞仪(安诺伦<北京>生物科技有限公司)。

试剂: Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, 北京索莱宝科技有限公司); 胎牛血清(FBS, 赛默飞世尔科技<中国>有限公司); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、白细胞介素6(IL-6)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海将来实业股份有限公司); DCFH-DA(西格玛奥德里奇<上海>贸易有限公司); miScript II RT kit(德国凯杰生物科技有限公司); SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒(宝日医生物技

术<北京>有限公司); CCK-8检测试剂盒(东仁化学科技<上海>有限公司); HIF-1 α 和GAPDH抗体(艾博抗<上海>贸易有限公司); HRP标记二抗(武汉三鹰生物技术有限公司); siRNA阴性对照(siRNA), SP-1-siRNA(si-SP-1), miR-136b mimic, mimic阴性对照(mimic NC), miR-136b inhibitor(anti-miR-136b), inhibitor阴性对照(anti-NC), HIF-1 α 3'-UTR端序列构建的野生型(WT)和突变型(MUT)报告基因质粒, 均由上海吉凯基因化学技术公司构建合成。

细胞: H9c2细胞(美国模式培养物保藏所)。

1.2 方法

细胞培养及转染: H9c2细胞用含10% FBS的DMEM培养基, 于37℃及5% CO₂饱和湿度条件下培养。待细胞密度达到80%~90%时, 0.25%胰酶液消化细胞, 含10% FBS的DMEM培养基将细胞重悬, 将细胞接种于6孔板内, 5×10^4 个/孔, 于37℃及5% CO₂饱和湿度条件下培养24 h后进行细胞转染。配制转染混合液A, 将siRNA, si-SP-1, miR-136b mimic, mimic NC, anti-miR-136b, anti-NC和氯化钴(CoCl₂, HIF-1 α 激活剂)分别用opti-MEM稀释, 总体积为250 μ L, siRNA和si-SP-1终浓度为100 nmol/L, CoCl₂终浓度为50 μ mol/L^[12], 其余序列终浓度为50 nmol/L, 混匀, 室温孵育5 min; 配制转染混合液B, 10 μ L Lipofectamine 2000加入240 μ L opti-MEM中, 混匀, 室温孵育5 min。将A液和B液混匀, 室温孵育20 min, 加入6孔板内。细胞于37℃及5% CO₂饱和湿度条件下培养5 h后, 更换新鲜培养基, 并于正常氧含量(21% O₂)或缺氧(3% O₂)条件下继续培养48 h后, 进行后续实验。

qRT-PCR法检测H9c2细胞中miR-135b表达: 收集缺氧后或转染48 h后的H9c2细胞, Trizol法提取细胞总的RNA, 微量分光光度计检测RNA浓度。应用miScript II RT kit将1 μ g RNA逆转录成cDNA。按SYBR® Premix Ex Taq™ II试剂盒说明, 配制25 μ L反应体系。miR-135b上游引物为5'-

CCAGGCTTCCAGTA CCATTAGG - 3', 下游引物为 5' - GCTTATGGCTTTTCATTCCCT - 3'; U6 上游引物为 5' - CTCGCTTCGGCAGCACA - 3', 下游引物为 5' - AACGCTTCACGAATTTGCGT - 3'。反应条件为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。以 U6 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR - 135b 表达。

CCK - 8 法检测细胞增殖: 将转染后的 H9c2 细胞接种于 96 孔板中, 5×10^3 个/孔, 细胞于 37 °C 及 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h。向每孔内加入 10 μ L CCK - 8 溶液, 37 °C 条件下孵育 3 h。利用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度。

流式细胞术检测细胞凋亡: 收集转染后的 H9c2 细胞, Annexin V - FITC 和 PI 室温条件下避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

ELISA 检测细胞 TNF - α , IL - 1 β , IL - 6 含量: 收集转染后的 H9c2 细胞培养物上清液, 1 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 按试剂盒说明书检测。

流式细胞术检测细胞内活性氧簇 (ROS): H9c2 细胞转染后, 移除培养物上清液, 加入 DCFH - DA (浓度为 10 μ mol/L), 37 °C 条件下孵育 30 min, 随后移除 DCFH - DA, 收集细胞, 流式细胞仪检测。

蛋白质印迹 (Western Blot, WB) 法检测细胞 HIF - 1 α 蛋白表达: 收集转染后的 H9c2 细胞, RIPA 裂解液裂解细胞, 12 000 r/min 离心取上清液, BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μ g 样本蛋白进行 SDS - PAGE 分离, 随后将目的蛋白转至 PVDF 膜上。经 10% 脱脂奶粉封闭后, 加入一抗 HIF - 1 α (1 : 1 000 稀释) 和 GAPDH (1 : 1 500), 4 °C 下过夜孵育, 再加入 HRP 标记二抗 (1 : 2 500 稀释) 室温孵育 1 h 后, ECL 发光、曝光。

荧光素酶报告基因实验检测 miR - 135b 和 HIF - 1 α 靶向关系: 针对 HIF - 1 α 3' - UTR 端序列构建野生型 (WT) 和突变型 (MUT) 报告基因质粒。依法进行细胞转染, 将 HIF - 1 α 的 WT 和 MUT 载体分别与 mimic NC, miR - 135b mimic 转染至 H9c2 细胞中, 48 h 后检测荧光素酶活性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析。数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One - way ANOVA)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧对 H9c2 细胞 SP - 1 和 miR - 135b 表达的影响

结果见图 1 和表 1。与 0 h 相比, H9c2 细胞在缺氧条件下分别培养 12, 24, 48, 72 h 后, 细胞内 SP - 1 蛋白表达呈时间依赖性显著升高 (P < 0.05), miR - 135b 表达呈时间依赖性显著降低 (P < 0.05)。

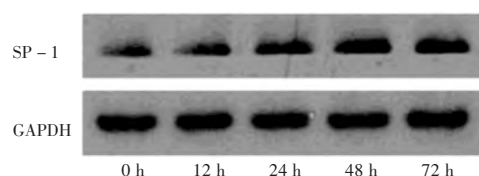


图 1 缺氧后 H9c2 细胞中 SP - 1 蛋白的表达水平

表 1 缺氧后 H9c2 细胞中 SP - 1 蛋白和 miR - 135b 表达的变化情况 ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

时间	SP - 1 蛋白表达	miR - 135b 表达
0 h	1.032 $\pm$ 0.144	1.023 $\pm$ 0.106
12 h	1.298 $\pm$ 0.071 ^a	0.780 $\pm$ 0.059 ^a
24 h	1.360 $\pm$ 0.115 ^a	0.697 $\pm$ 0.071 ^a
48 h	1.552 $\pm$ 0.112 ^a	0.512 $\pm$ 0.058 ^a
72 h	1.607 $\pm$ 0.113 ^a	0.445 $\pm$ 0.032 ^a

注: 与 0 h 相比, ^aP < 0.05。

2.2 SP - 1 低表达对缺氧后 H9c2 细胞增殖和凋亡的影响

结果见表 2、图 2 和图 3。与对照组 (A 组) 相比, 缺氧组 (B 组) H9c2 细胞中 SP - 1 的蛋白表达和细胞凋亡率均显著升高 (P < 0.05), 细胞增殖能力显著降低 (P < 0.05); 与缺氧 + siRNA 组 (C 组) 相比, 缺氧 + si - SP - 1 组 (D 组) H9c2 细胞中 SP - 1 的蛋白表达和细胞凋亡率均显著降低 (P < 0.05), 细胞增殖能力显著升高 (P < 0.05)。

表 2 SP - 1 低表达对缺氧后 H9c2 细胞增殖和凋亡的影响 ($\bar{X} \pm s, n = 3$)

组别	SP - 1 蛋白表达	细胞增殖 (%)	细胞凋亡 (%)
A 组	1.021 $\pm$ 0.110	100.989 $\pm$ 4.948	3.697 $\pm$ 0.484
B 组	1.467 $\pm$ 0.055 ^a	67.242 $\pm$ 3.490 ^a	14.591 $\pm$ 1.863 ^a
C 组	1.463 $\pm$ 0.087	66.508 $\pm$ 2.190	15.380 $\pm$ 1.176
D 组	0.238 $\pm$ 0.039 ^b	83.550 $\pm$ 2.933 ^b	4.668 $\pm$ 0.731 ^b

注: 与 A 组相比, ^aP < 0.05; 与 C 组相比, ^bP < 0.05。表 3 和表 4 同。

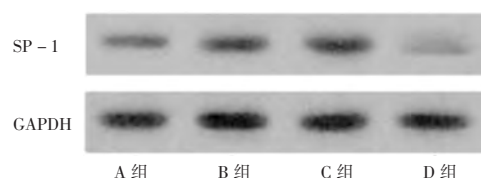


图 2 WB 法检测 H9c2 细胞中 SP - 1 蛋白的表达水平

2.3 SP - 1 低表达抑制缺氧诱导 H9c2 细胞炎症因子和 ROS 的产生

结果见图 4 和表 3。与 A 组相比, B 组 H9c2 细胞上清液中 TNF - α , IL - 1 β , IL - 6, ROS 含量均显著升高 (P < 0.05); 与 C 组相比, D 组 H9c2 细胞上清液中 TNF - α , IL - 1 β , IL - 6, ROS 含量均显著降低 (P < 0.05)。

2.4 SP - 1 低表达对缺氧后 H9c2 细胞 HIF - 1 α 和 miR - 135b 表达的影响

结果见图 5 和表 4。与 A 组相比, B 组 H9c2 细胞中

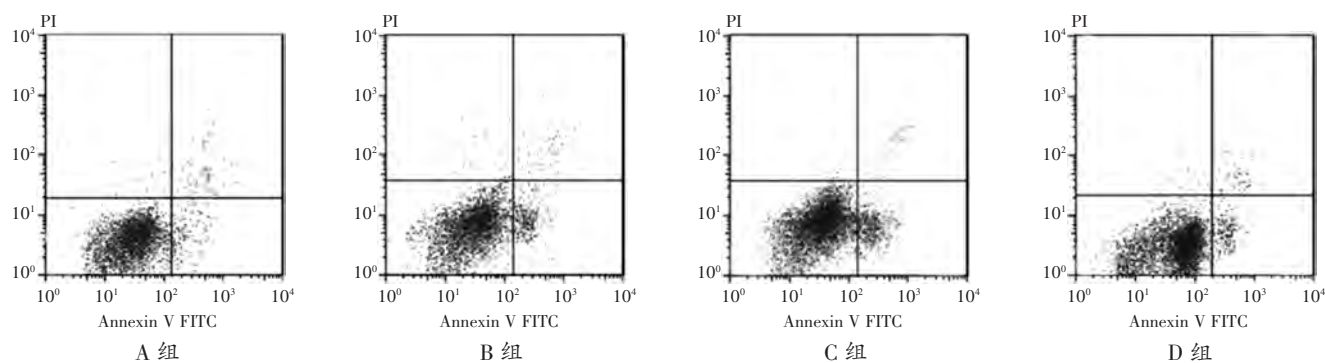


图3 流式细胞术检测 H9c2 细胞凋亡结果

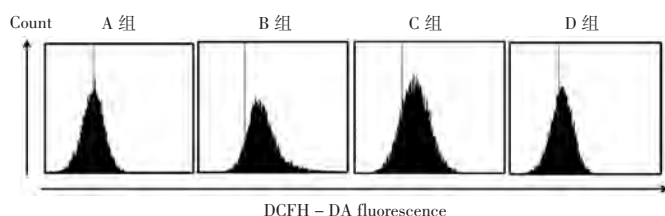


图4 H9c2 细胞中 ROS 水平

表3 SP-1 低表达对缺氧后 H9c2 细胞炎症因子水平和 ROS 含量的影响 ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	ROS 相对含量
A 组	2.289 $\pm$ 0.300	13.387 $\pm$ 0.954	28.556 $\pm$ 1.761	1.032 $\pm$ 0.080
B 组	5.270 $\pm$ 0.359 ^a	25.060 $\pm$ 1.212 ^a	82.707 $\pm$ 4.550 ^a	1.239 $\pm$ 0.075 ^a
C 组	5.284 $\pm$ 0.561	25.923 $\pm$ 1.431	85.369 $\pm$ 3.937	1.264 $\pm$ 1.059
D 组	3.901 $\pm$ 0.354 ^b	17.198 $\pm$ 1.216 ^b	56.742 $\pm$ 4.081 ^b	1.086 $\pm$ 0.090 ^b

HIF-1 α 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), miR-135b 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与 C 组相比, D 组 H9c2 细胞中 HIF-1 α 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), miR-135b 表达显著升高 ($P < 0.05$)。

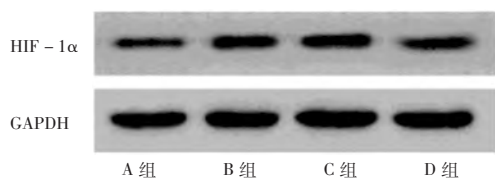


图5 SP-1 低表达对缺氧后 H9c2 细胞中 HIF-1 α 蛋白表达的影响

表4 H9c2 细胞中 miR-135b 表达和 HIF-1 α 蛋白表达 ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	HIF-1 α 蛋白表达	miR-135b 表达
A 组	1.001 $\pm$ 0.121	1.053 $\pm$ 0.160
B 组	1.437 $\pm$ 0.082 ^a	0.466 $\pm$ 0.071 ^a
C 组	1.476 $\pm$ 0.130	0.473 $\pm$ 0.040
D 组	1.126 $\pm$ 0.100 ^b	0.752 $\pm$ 0.094 ^b

2.5 miR-135b 靶向调控 HIF-1 α 基因

miR-135b 与 HIF-1 α mRNA 3'-UTR 的结合位点见图 6。由图 7 和表 5 显示, 与 mimic NC 组(E 组)相比, miR-135b mimic 组(F 组)H9c2 细胞中 miR-135b 表达显著升高 ($P < 0.05$), HIF-1 α 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), HIF-1 α -WT 荧光素酶活性显著降低 ($P <$

0.05), 而 HIF-1 α -MUT 荧光素酶活性无明显变化 ($P > 0.05$); 与 anti-NC 组(G 组)相比, anti-miR-135b 组(H 组)H9c2 细胞中 miR-135b 表达显著降低 ($P < 0.05$), HIF-1 α 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。



图6 miR-135b 和 HIF-1 α 3'-UTR 结合位点

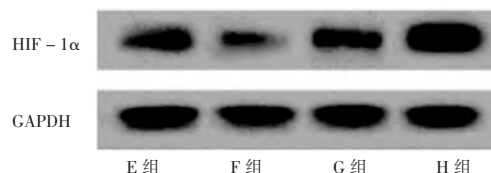


图7 miR-135b 对 H9c2 细胞中 HIF-1 α 蛋白表达的影响

表5 miR-135b 靶向调控 HIF-1 α 基因 ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	相对荧光素酶活性		miR-135b 表达	HIF-1 α 蛋白表达
	HIF-1 α -WT	HIF-1 α -MUT		
E 组	1.021 $\pm$ 0.102	1.011 $\pm$ 0.101	1.019 $\pm$ 0.101	1.037 $\pm$ 0.078
F 组	0.425 $\pm$ 0.039 ^a	1.108 $\pm$ 0.119	1.742 $\pm$ 0.097 ^a	0.411 $\pm$ 0.031 ^a
G 组			0.992 $\pm$ 0.101	0.983 $\pm$ 0.099
H 组			0.424 $\pm$ 0.040 ^b	1.319 $\pm$ 0.071 ^b

注: 与 E 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 G 组相比, ^b $P < 0.05$ 。

2.6 anti-miR-135b 和 HIF-1 α 激动剂对 si-SP-1 转染的缺氧 H9c2 细胞中 miR-135b 和 HIF-1 α 表达的影响

结果见图 8 和表 6。与 si-SP-1 组(I 组)相比, si-SP-1 + CoCl₂ 组(J 组)H9c2 细胞中 miR-135b 表达无明显变化 ($P > 0.05$), HIF-1 α 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与 si-SP-1 + anti-NC 组(K 组)相比, si-SP-1 + anti-miR-135b 组(L 组)H9c2 细胞中 miR-135b 表达显著降低 ($P < 0.05$), HIF-1 α 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。

2.7 SP-1/miR-135b/HIF-1 α 轴对缺氧后 H9c2 细胞增殖和凋亡的影响

结果见图 9 和表 7。与 I 组相比, J 组 H9c2 细胞增殖能力显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$); 与 K 组相比, L 组 H9c2 细胞增殖能力显著降低 ($P <$

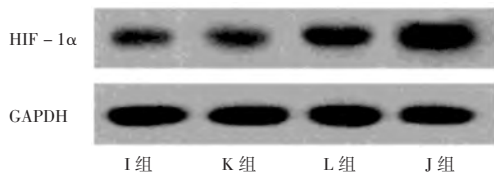


图8 H9c2 细胞中 HIF-1α 的蛋白表达

表6 H9c2 细胞中 miR-135b 和 HIF-1α 的表达 ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	miR-135b 表达	HIF-1α 蛋白表达
I 组	0.999 ± 0.123	1.009 ± 0.117
J 组	1.064 ± 0.090 ^a	2.220 ± 0.114 ^a
K 组	1.065 ± 0.100	1.075 ± 0.071
L 组	0.206 ± 0.027 ^b	1.560 ± 0.097 ^b

注:与 I 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 K 组相比, ^b $P < 0.05$ 。下表同。

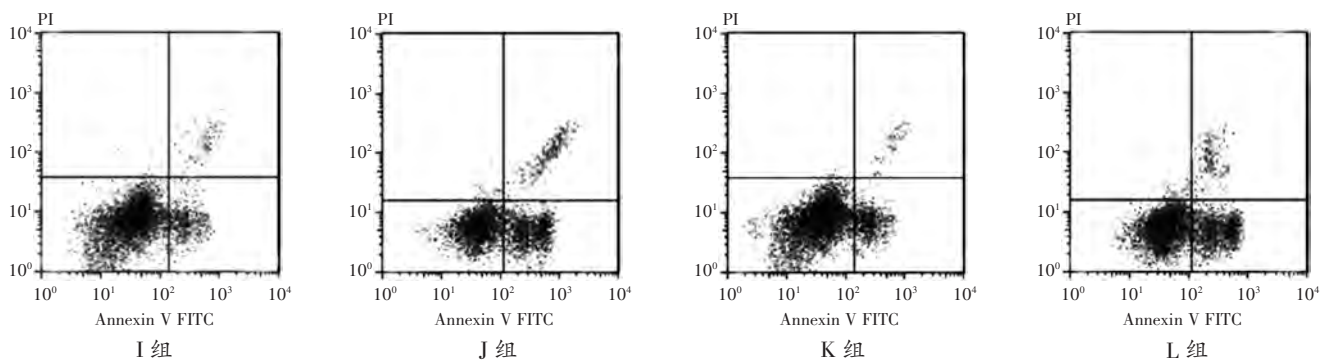


图9 SP-1/miR-135b/HIF-1α 轴对缺氧后 H9c2 细胞凋亡的影响

表7 H9c2 细胞增殖和凋亡的变化 ($\bar{X} \pm s, \%, n=3$)

组别	细胞增殖	细胞凋亡
I 组	100.630 ± 6.418	15.293 ± 0.409
J 组	48.470 ± 2.831 ^a	41.076 ± 1.117 ^a
K 组	93.753 ± 6.995	16.970 ± 0.353
L 组	63.728 ± 4.192 ^b	35.935 ± 1.776 ^b

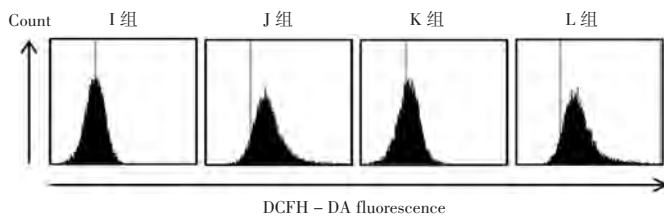


图10 SP-1/miR-135b/HIF-1α 轴对缺氧后 H9c2 细胞 ROS 水平的影响

表8 H9c2 细胞上清液中 ROS 和炎症因子的含量变化 ($\bar{X} \pm s, n=3$)

组别	ROS 相对含量	TNF-α (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
I 组	1.028 ± 0.100	4.113 ± 0.395	22.992 ± 2.960	87.042 ± 4.052
J 组	1.351 ± 0.073 ^a	6.211 ± 0.408 ^a	43.417 ± 2.561 ^a	110.440 ± 7.446 ^a
K 组	1.092 ± 0.059	4.140 ± 0.164	24.005 ± 2.582	87.390 ± 6.532
L 组	1.327 ± 0.041 ^b	5.250 ± 0.325 ^b	38.675 ± 1.956 ^b	108.767 ± 6.589 ^b

氧促进细胞凋亡,负责病理过程中心肌的解剖重塑^[16]。缺血引起的缺氧在心肌缺血性疾病期间可诱导心肌细胞凋亡和氧化应激^[17]。SP-1 是调控多种基因的关键转录因子,这些基因对疾病的发生和发展至关重要^[18]。

0.05),细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。

2.8 SP-1/miR-135b/HIF-1α 轴对缺氧后 H9c2 细胞损伤的影响

结果见图 10 和表 8。与 I 组相比, J 组 H9c2 细胞 ROS, TNF-α, IL-1β, IL-6 的含量显著升高 ($P < 0.05$); 与 K 组相比, L 组 H9c2 细胞 ROS, TNF-α, IL-1β, IL-6 的含量显著升高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

心肌缺血是急性心肌梗死的常见原因,可引起不可逆的心肌损伤,包括心肌细胞凋亡和氧化损伤^[13-14]。缺氧刺激是心血管疾病(如心肌梗死、主动脉瘤和冠状动脉粥样硬化性心脏病)病理生理机制的重要因素^[15]。缺

SP-1 可促进缺氧后血管内皮细胞中环氧化酶 2 的表达,从而促进环氧化酶 2 在主动脉瘤和心力衰竭中的局部表达^[19]。SP-1 与心脏疾病密切相关,但其对缺氧后心肌细胞损伤的作用尚不清楚。

研究表明,SP-1 与心肌细胞的增殖相关^[4],SP-1 的激活与炎症和心脏肥大相关^[20]。本研究结果显示,干扰 SP-1 表达可减轻缺氧诱导的心肌细胞损伤。miRNA 是一种小的、内源性非编码 RNA 分子。临床研究和动物实验表明,miRNA 是心脏缺血的潜在生物标志物和治疗靶标^[21]。此外,一些 miRNA 在心肌细胞程序性死亡中起调节作用^[22]。心肌梗死可上调心脏 SP-1 的表达,miR-7 a/b 通过抑制 SP-1 的表达在心肌梗死诱导的心肌缺血和心室重构中发挥保护作用^[23]。miR-135b 是心肌缺血再灌注损伤的重要调节剂^[24],其过表达改善心功能受损,抑制 NLRP3/caspase-1/IL-1β 途径的上调^[8]。SP-1 和 HIF-1α 同时抑制缺氧状态下人微血管内皮细胞(HMEC-1)的增殖、迁移和侵袭^[25]。本研究结果显示,SP-1 是 miR-135b 和 HIF-1α 的上游基因,可调控 miR-135b 和 HIF-1α 的表达。miR-135b 可靶向调控 H9c2 细胞中 HIF-1α 蛋白表达,这与 SUN 等^[6]的研究结果一致。

眼部的慢性低氧/复氧损伤会导致 HIF-1α 水平上调,奥拉帕尼可通过降低 HIF-1α 水平发挥视网膜

保护作用^[26]。抑制 HIF-1 α 表达可减轻低氧性肺泡上皮细胞的炎症反应^[27]。右美托咪定通过抑制 HIF-1 α 抑制大鼠神经元细胞凋亡,改善脑缺血再灌注损伤^[28]。miR-135b 过表达促进人脐静脉内皮细胞增殖,抑制凋亡^[29]。体内和体外心肌细胞损伤后,miR-135b 的表达均下调,miR-135b 过表达可显著抑制 ROS 的产生和 NLRP3/caspase-1/IL-1 β 炎症通路的上调^[8]。本研究表明,CoCl₂ 和 anti-miR-135b 会逆转低表达 SP-1 对缺氧 H9c2 细胞的保护作用。低表达 SP-1 通过 miR-135b 抑制 HIF-1 α 的表达,发挥对缺氧诱导的心肌细胞损伤的保护作用。

综上所述,SP-1 低表达通过 miR-135b/HIF-1 α 轴发挥对缺氧诱导的心肌细胞损伤的保护作用。此结果可为进一步明确心肌细胞损伤机制和心肌缺血性疾病的治疗提供参考。后续研究中将进一步探讨 SP-1 低表达通过 miR-135b/HIF-1 α 轴在心肌缺血性疾病动物模型中的作用。

参考文献:

- [1] HAZINI A, CEMEK M, ILDAK , et al. Investigation of ischemia modified albumin, oxidant and antioxidant markers in acute myocardial infarction[J]. *Advances in Interventional Cardiology*, 2015, 11(4):298-303.
- [2] TURILLAZZI E, POMARA C, BELLO S, et al. The meaning of different forms of structural myocardial injury, immune response and timing of infarct necrosis and cardiac repair[J]. *Current Vascular Pharmacology*, 2015, 13(1):6-19.
- [3] AL AKOUM C, AKL I, ROUAS R, et al. NFAT-1, Sp-1, Sp-3, and miR-21: New regulators of chemokine C receptor 7 expression in mature human dendritic cells[J]. *Human Immunology*, 2015, 76(5):307-317.
- [4] HAMMOUD L, BURGER DE, LU X, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits neonatal mouse cardiomyocyte proliferation via EGFR/JNK/SP-1 signaling[J]. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2009, 296(4):C735-C745.
- [5] WEISS CN, ITO K. A macro view of microRNAs: the discovery of microRNAs and their role in hematopoiesis and hematologic disease[J]. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2017, 334:99-175.
- [6] SUN W, MIN B, DU D, et al. miR-181c protects CsA-induced renal damage and fibrosis through inhibiting EMT[J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(21):3588-3599.
- [7] CHU Q, LI AQ, CHEN X, et al. Overexpression of miR-135b attenuates pathological cardiac hypertrophy by targeting CACNA1C[J]. *International Journal of Cardiology*, 2018, 269:235-241.
- [8] LI AQ, DING XY, YU Y, et al. MiR-135b protects cardiomyocytes from infarction through restraining the NLRP3/caspase-1/IL-1 β pathway[J]. *International Journal of Cardiology*, 2020, 307:137-145.
- [9] YANG J, LIU C, DU X, et al. Hypoxia inducible factor 1 α plays a key role in remote ischemic preconditioning against stroke by modulating inflammatory responses in rats[J]. *Journal of the American Heart Association*, 2018, 7(5):e007589.
- [10] POPRAVKA ES, LINK A NS, ROFIMOVA SV, et al. HIF-1 as a Marker of Age-Related Diseases Associated with Tissue Hypoxia[J]. *Biology Bulletin Reviews*, 2018, 8(6):497-508.
- [11] DONG Y, WANG J, DU KX, et al. MicroRNA-135a participates in the development of astrocytes derived from bacterial meningitis by downregulating HIF-1 α [J]. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2019, 316(5):C711-C721.
- [12] 平 珍. 血管内皮生长因子(VEGF)对 caspase-3 表达的影响及梗死区缺氧损伤的心肌细胞保护的机制研究[D]. 郑州:郑州大学, 2016.
- [13] TERINGOVA E, TOUSEK P. Apoptosis in ischemic heart disease[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2017, 15(1):87.
- [14] LINDSEY ML, BOLLI R, CANTY JR JM, et al. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction[J]. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2018, 314(4):H812-H838.
- [15] LIU Y, ZOU J, LI B, et al. RUNX3 modulates hypoxia-induced endothelial-to-mesenchymal transition of human cardiac microvascular endothelial cells[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 40(1):65-74.
- [16] ZHOU QQ, PENG XG, LIU X, et al. FAT10 attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis by stabilizing caveolin-3[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2018, 116:115-124.
- [17] JING LL, LI Q, HE L, et al. Protective Effect of Tempol Against Hypoxia-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in H9c2 Cells[J]. *Medical Science Monitor Basic Research*, 2017, 23:159-165.
- [18] PRATHYUSHA A, NAWADKAR R, BRAMHACHARI PV. Role of Spl Transcription Factor in Gastrointestinal Carcinogenesis[M]// *Role of Transcription Factors in Gastrointestinal Malignancies*. Springer: Singapore, 2017:193-204.
- [19] YOSHIDA E, KURITA M, ETO K, et al. Methylmercury promotes prostacyclin release from cultured human brain microvascular endothelial cells via induction of cyclooxygenase-2 through activation of the EGFR-p38 MAPK pathway by inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B activity[J]. *Toxicology*, 2017, 392:40-46.
- [20] HAYBAR H, SHAHRABI S, REZAEYAN H, et al. Protective role of heat shock transcription factor 1 in heart failure: A diagnostic approach[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(6):7764-7770.
- [21] NILESH K, KELLY B, GEORGE C. MicroRNAs: Clinical Trials and Potential Applications? [J]. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, 2017, 21(5):554-559.
- [22] LI X, ZENG L, CAO C, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates renal tubular epithelial pyroptosis by modulated miR-